

哺乳动物核移植中供核与受体卵胞质 细胞周期的相互关系*

李劲松¹⁾ 陈大元^{**}

(中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 就供核与受体卵胞质细胞周期的相互关系问题进行了综述. 核移植技术不管是在基础理论, 还是在应用研究中都具有广泛的应用价值, 但核移植的效率却很低, 其根本原因是与核移植相关的许多基础理论问题尚不清楚, 对这些问题的研究发现, 维持重构卵核的正确倍性, 并使其重新程序化是核移植成功的关键, 不同的胞质受体及不同的供体细胞及其状态均对重构胚的发育有影响.

关键词 核移植, 核质关系, 重编程, 细胞周期

学科分类号 Q81, Q78

在过去的 20 年, 特别是 20 世纪的最后几年中, 哺乳动物核移植技术有了飞速的发展. 以前的核移植仅局限于原核互换^[1]或用早期胚胎的卵裂球^[2]作为供核, 到 1995 年, 才真正进入了核移植的时代. Campbell 等^[3]用培养的分化细胞作为供核, 诞生了两只羊羔 (Megan 和 Morag). 1997 年, Wilmut 等^[4]报道了第一只用成年动物体细胞克隆的动物——“多莉”. 这一被喻为具有划时代意义的结果, 诱发了生物学界的一场动物克隆风暴, 克隆鼠、牛、山羊、猴、猪等动物纷纷诞生. 人们从这些结果中看到了核移植技术广阔的应用前景, 如在家畜改良、拯救濒危动物、以及人类医疗等方面, 都有着不可估量的作用.

核移植技术最早是为了研究细胞分化中遗传物质所起的作用而提出的, 也就是为了研究核质之间的关系问题. 然而到核移植技术日趋成熟, 并已得到广泛应用的今天, 核移植过程中核质之间的相互关系却仍然未彻底弄清楚. 在过去的 10 年中, 研究细胞周期的作用以及供核与受体胞质的相互作用, 大大提高了重构胚的发育率, 而且对从分化的体细胞中产生“克隆”动物起了作用, 本文综述了供核细胞与受体胞质细胞周期的相互关系.

1 核移植的受体与供体

1.1 受体

到目前为止, 已有三类受体细胞用于核移植产生了后代, 第一类是去除原核的合子, 典型的例子是由 McGrath 和 Solter^[1]将原核移入去除原核的合子中获得了小鼠, 但此类受体仅局限于用原核或假

原核作为供体. 第二类是早期胚胎, 如 Tsunoda 等^[2]将 8 细胞卵裂球移入去核的 2 细胞中获得了小鼠, 但在这之前, Kelly^[5]的工作已证明 8 细胞卵裂球仍具有全能性, 所以这类受体也只适合于具有全能性的卵裂球. 第三类受体即是 M II 卵母细胞, 这是哺乳动物核移植使用最多的一类受体, 用这一类受体接受各阶段胚胎的卵裂球, 早期胎儿细胞、体细胞或 ES 细胞均获得了后代.

在 M II 期卵子胞质中存在一类重要的蛋白质因子^[6], 称为成熟/有丝分裂/减数分裂促进因子 (MPF). MPF 是由 cyclin 和 P34^{cdc2}构成的蛋白质复合体, 是一类蛋白激酶, 其活性由其磷酸化状态所控制. MPF 的活性在卵母细胞第一和第二次减数分裂的分裂期最高. 成熟的哺乳动物卵停滞在 M II 期, 并维持着高的 MPF 活性. 一旦受精或被激活, MPF 活性急剧下降, 第二次减数分裂完成并排出第二极体, 染色质发生凝集, 形成原核. 因此, 用 M II 作为受体与合子作为受体具有完全不同的胞质环境, 前者 MPF 活性很高, 后者 MPF 活性已经很低.

1.2 供体细胞

用于核移植的细胞有多种, 最早采用早期胚胎的卵裂球, 这在 1997 年 Wilmut 等报道“多莉”羊

* 中国科学院知识创新重大项目 (KSCX1-05-01) 和科技部攀登项目 (95-专-08).

** 通讯联系人.

¹⁾ 扬州大学畜牧兽医学院, 扬州 225009.

Tel: 010-62560528, E-mail: chendy@panda.ioz.ac.cn

收稿日期: 2001-08-17, 接受日期: 2001-10-18

之前的文献主要是以此类细胞作为供核, 这些细胞具有全能性或多能性, 相对来说核移植的成功率高. 用培养的干细胞作为供核的研究也不少^[7], 因为干细胞也被认为是具有多能性或全能性的. 到1996年, Campbell等^[3]报道用培养的绵羊胚胎细胞的1~3代或用经休眠处理的6~13代作为供核进行核移植获得了后代. 其实他们所用的细胞也已经发生了分化, 但这种分化很有限. Dolly是第一次用高度分化的哺乳动物体细胞作为供核获得的个体, 第一次证实了体细胞核仍具有全能性. 这一结果不仅具有重大的理论价值, 而且为人们展示了核移植技术广阔的应用前景, 因此研究体细胞核移植的核质相互关系, 提高核移植效率具有重要的意义.

正常生长的体细胞或培养的体细胞中, 大部分进行着有丝分裂, 它们经过G1、S、G2、M四个阶段完成一次细胞周期, 由一个细胞变成两个细胞. G1期是处于M期与S期之间的一个阶段, 这一阶段决定细胞是否开始一个细胞周期, 并为细胞进入S期作好准备, 此时细胞核为2倍体. 进入S期, DNA开始合成, 这一阶段的核物质处于活跃的复制状态. G2期是位于S期和M期之间的时期, 该期的细胞核为4倍体. 经过M期, 在S期复制的遗传物质被平均地分配到两个子细胞中. 处于不同细胞周期时相的细胞核移入受体卵母细胞中后, 也会发生不同的变化.

2 影响重构胚发育的几个因素

核移植重构胚成功发育取决于一系列的因素^[8], 如卵子的质量、重构的程序、培养的条件、受体和供体细胞的细胞周期阶段等. 前面几个因素都是实验技术方面的问题, 受体和供体细胞的细胞周期阶段则是涉及到核质相互关系问题, 这是取决于重构胚成功发育最关键的因素之一. 我们假设其他方面条件均已成熟的情况下, 核质关系对重构胚发育的影响主要表现在两个方面, 一是维持重构胚核的正常倍性; 二是诱导分化的供核去分化、重编程、恢复全能性.

2.1 维持重构胚核的正确倍性

当供核移入高MPF活性的M II卵中时, 会发生核膜破裂 (nuclear envelope breaks down, NEBD) 以及成熟前染色质凝集 (prematurely chromosomes condense, PCC). NEBD和PCC的程度取决于MPF的活性以及核在MPF中的时间.

NEBD发生后, 使胞质中的因子可以接近DNA, 所有的核无论处于什么细胞周期都开始进行DNA复制. 而PCC对核染色质的影响取决于供核的细胞周期, 处于G1/G0期的细胞, 其核为二倍体, 会凝集成单个染色单体, 而4倍体核 (G2期) 凝集成双倍染色单体. 在这些情况下, PCC不会引起明显的遗传损伤. 而处于活跃复制的核 (S期) 则会形成典型的“粉末状”形态, 这就会引起DNA损伤. 随着胞质被激活, MPF活性下降, 染色体去凝集, 核膜重新形成, 在胞质因子的作用下, DNA开始复制.

因此, 重构胚的正确倍性可以通过两种方法来获得, 第一是移入有确定细胞周期阶段的细胞核, 如将G1期双倍体核移入正被激活的M II期卵中. 这一方法已被几家实验室采用并提高了重构胚发育至囊胚的比率. Collas等分析了不同细胞周期阶段的兔胚胎卵裂球对核移植重构胚发育的影响, 发现同步在G1期的卵裂球作为供核的囊胚发育率显著升高了. 也有人在小鼠上用G2期和M期 (四倍体) 供核移入去核的M II期卵中获得了后代, 用G2期作为供核时, 从供核中排出第二极体表明有丝分裂或假减数分裂导致产生单个二倍体原核并排出一个二倍体极体. 用M期核作为供核, 作者用细胞松弛素B (CB) 抑制极体的排放, 将会形成两个原核, 每个原核移入去核的合子中获得了后代. 但在牛、羊、猪核移植中无极体排放的报道, 这可能是不同品种动物极体排放机制不同^[8]. 第二, 先激活受体卵母细胞, 并在无MPF活性后移入供核, 供核则不发生NEBD和PCC, DNA合成的发生则与移核时的细胞周期有关. 此时采用G1、S或G2期的细胞作为供核均可, Campbell^[6]将此受体称为“全能受体” (universal recipient). Campbell等^[9]用羊16细胞胚胎卵裂球作为供核移入第一类受体和第二类受体后发现, 后者重构胚囊胚发育率 (55.4%) 大大高于前者 (21.3%).

2.2 供核的重编程及核重构

早期胚胎的发育是由母性遗传的RNA和蛋白质控制的, 合子核很少或几乎没有转录, 在发育的特定阶段开始由合子核来控制, 这一变化的特征是出现了大量可测的转录现象. 合子核以时空调控的方式控制发育, 最终导致形成特定分化的细胞类型. 分化基因的表达是如何控制的, 所知甚少. 但DNA甲基化引起的遗传印迹与分化基因的表达有关. 因此移入的核要获得成功的发育, 需要具有正

常的合子核的特征, 必须先放弃转录, 然后重新建立时空和定量的基因表达, 这一转变过程取决于受体胞质对供核的作用. Campbell^[8]认为供核暴露在受体胞质高 MPF 活性的环境中, 促进染色质的凝集将加速胞质中有关因子与核的交换, 可以改善随后的发育. 然而在这种环境中, 供核会发生 NEBD 和 PCC, 因此好的发育与供核的细胞周期密切相关. 处于 G1/G0 期细胞有利于重构胚的发育, 而 S 期的细胞将导致产生碎片化. 在老鼠^[10]、兔子^[11]中, 移入活跃转录的囊胚核以后发生核转录的抑制, 并出现了合子基因的表达, 这表明发生了重编程. 在牛中, de Sousa 等^[12]用胎儿成纤维细胞核移入去核 M II 卵后, 重构胚发生基因转录的

逆转, 出现了类似于着床前的胚胎发育现象.

供核除了要发生重编程外, 还必须在受体胞质中能够运行和维持 DNA 复制和分裂的真实性, 这就需要调整核与染色质的结构. 核膨胀常被作为核编程的一个指示, 但其也可作为核重构的指示, 这些变化都是供核能在受体胞质中正常发育的前提.

3 用 M II 卵母细胞作为受体几种不同的核质组合

前面已经讨论过, 为了获得好的重构胚发育率, 既要保持重构胚正确的倍性, 又要使供核能发生重编程, 为此要协调好受体胞质与供体细胞的关系, 在已有的文献中采用了以下几种核质组合, 见图 1.

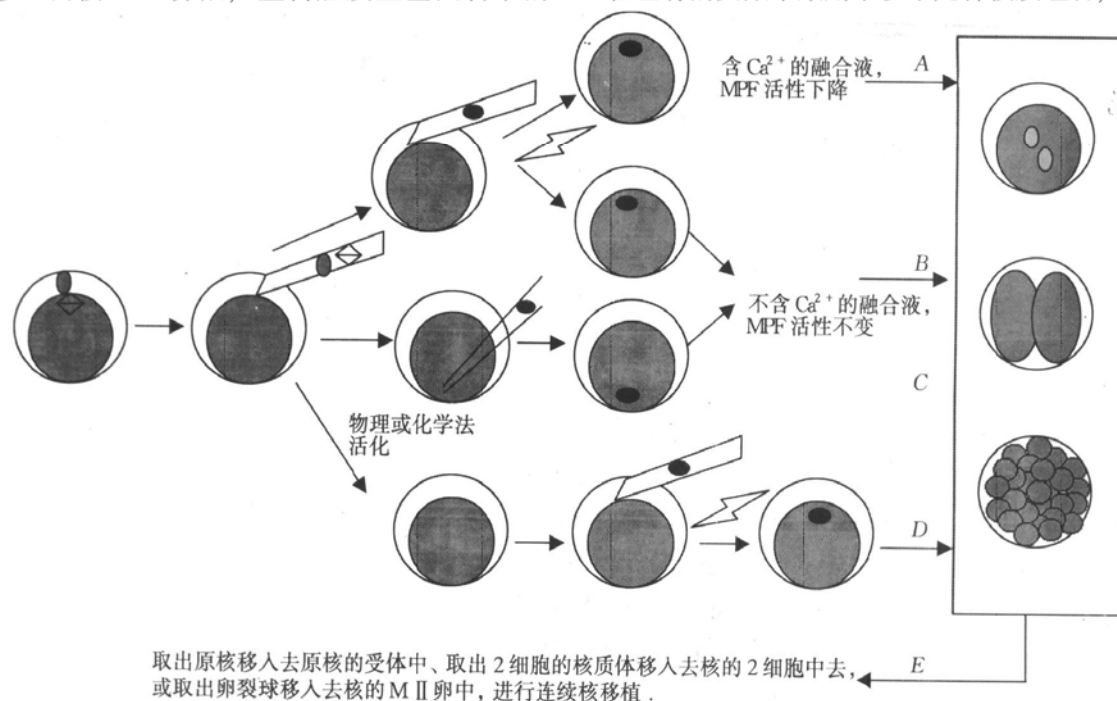


Fig. 1 Different nuclear cytoplasmic combinations when using M II oocytes as recipients

图 1 用 M II 卵作为受体的几种不同的核质组合

A: 同时活化; B: 延迟活化 (不含 Ca^{2+} 的融合液); C: 延迟活化 (直接注射); D: 预活化; E: 连续核移植.

3.1 移核的同时伴随 MPF 活性的下降

大部分核移植工作采用的都是这一组合. 也就是将供核移入去核 M II 卵母细胞卵周隙后, 通过电刺激, 诱导卵母细胞膜与供体细胞膜发生融合, 由于融合液中存在 Ca^{2+} , 电刺激的同时也可使卵胞质中 Ca^{2+} 浓度瞬时升高, 从而使稳定 MPF 活性的细胞生长抑制因子 (CSF) 失活, 最终导致 MPF 活性下降^[13]. 这一组合应用于卵裂球及体细胞作为供核均获得了后代.

3.2 延迟活化

这一组合可以通过两种方式完成. 第一, 将供体细胞核直接注入去核 M II 卵母细胞中^[14], 使供核在高 MPF 活性环境中处理一段时间后再激活卵母细胞; 第二是将细胞通过电融合的方式融入卵母细胞中^[15], 但此时的电融合液中不含 Ca^{2+} , 不会诱发卵母细胞活化, 从而维持 MPF 的高活性. 这一组合使供体细胞核在高 MPF 活性中充分暴露, 有利于核的重编程. 这两种方法在体细胞克隆鼠的

研究中均获得成功。

3.3 预先活化卵母细胞

卵母细胞去核后先活化或者活化处理后再去核,使MPF活性下降再移入供体细胞。这一组合可以接受来自各个细胞周期阶段的供核,但对核的重编程似乎不利。因此,作者认为该组合适合于早期卵裂球作为供核,从我们实验可以看出,用卵裂球作为供核移入预活化的卵母细胞中可以改善囊胚发育率(未发表)。Piotrowska等^[16]发现兔8细胞卵裂球或重构胚8细胞卵裂球移入预先活化的卵母细胞中后获得最好的重构胚发育率。

3.4 连续核移植

将供核移入去核卵母细胞后获得重构胚,再以重构胚的卵裂球作为供核移入去核卵母细胞。Campbell^[8]假设此方法可通过多次将供核暴露在卵胞质环境中,从而促进供核重编程。Piotrowska等^[16]用兔8细胞卵裂球进行连续核移植并没有影响重构胚发育率,将第三代连续核移植重构胚移入受体后获得了克隆个体。我们的实验用大熊猫体细胞移入去核兔卵母细胞后,获得的重构胚卵裂球作为供核进行连续核移植,也提高了重构胚发育率(未发表)。另外,在小鼠及猪的克隆中采用了连续核移植的方法,前者是用重构的2细胞胚胎的核质体移入去核的2细胞胚胎受体中,后者是将重构胚的原核移入去除原核的合子中均产生了后代。

4 供核细胞的休眠

4.1 什么是休眠

在细胞周期中,G1期对细胞进入S期起重要作用,一旦细胞通过G1期的检验点,则细胞进入S期。在不适的条件下,细胞会停滞在G1期或在G1期时退出细胞分裂周期,停滞在G1期的细胞称为G0期细胞,又可称为休眠细胞。休眠的细胞可以被认为是具有代谢活性,但没有分裂活性的含有两倍体DNA的细胞,可以通过改变培养细胞的条件诱导细胞进入休眠状态。常用的方法是血清饥饿方法。

4.2 对细胞进行休眠处理在核移植中的应用

休眠处理过后细胞,即G0期细胞作为供核具有以下几点优点。第一,可以获得细胞周期的协调,将这些细胞移入去核卵中随后活化或在活化时移入或移入预活化的卵中,均产生了个体。第二,休眠细胞的染色质发生凝集,转录和翻译水平下降,mRNA降解活跃。这些染色质结构和功能的

变化均有利于核移植。Campbell^[8]认为G0期细胞的染色质平衡于分化与未分化之间的状态可能更适用于对各种信号发生反应,另外,这种零状态细胞的染色质更易于对卵胞质控制基因表达的因子发生反应。不少实验结果可以支持这一假设。Otaegui和其合作者^[17]认为处于G2晚期、M期及G1早期的核(染色质去凝集不完全)比处于晚G1、S或早G2期供核的发育率高。从这些结果中可以推测供核染色质凝集导致转录因子的释放使卵胞质因子在染色质去凝集时更易于靠近,对培养的体细胞进行研究发现,处于M期时,转录因子的结合亲和力仍保持不变,但当染色质发生凝集时,这些因子就会被排出。

4.3 核移植中,是否必须对细胞进行休眠

Campbell等^[3]1995年用培养的已分化的绵羊胚胎细胞作为供核进行核移植,当用1~3代细胞时获得了个体,而用6~13代细胞却没有发育到期,但休眠后却获得了个体。1997年,Wilmot^[4]第一次用休眠过的成年动物体细胞进行核移植,获得了“多莉”羊。1998年,Wakayama等用处于G0期小鼠的活体细胞获得了克隆小鼠,随后,大量的克隆牛报道中均采用了休眠处理的细胞。似乎对培养细胞进行休眠处理是核移植成功的关键。然而,也有一些学者在进行克隆研究时却并未对供体细胞进行休眠处理或采用处于G0/G1期的新鲜细胞,如Cibelli等^[18]的克隆牛。但Campbell^[17]则认为在培养细胞的任何时候都存在一部分细胞停在G0期,这是获得克隆成功的条件。

但是,到目前为止,很难对用于核移植的某个细胞的周期阶段作精确的判断,因此,Campbell的观点也只能是一种推测。近一两年来,用未经休眠处理的细胞进行核研究的报道逐渐增多,Wakayama等^[19]用小鼠尾尖细胞作为供核进行核移植,比较了经血清饥饿处理和未经血清饥饿处理的细胞,两者均能获得后代。Ogura等^[19]用未经休眠培养的小鼠尾尖细胞作为供体,通过电融合的方法也获得了后代。因此,Campbell最近也承认,“我一直都很小心地说G0期可能对克隆有利,并没有说其他阶段的细胞不能用于克隆。”^[20]

5 展 望

哺乳动物体细胞核移植的成功最终证明了发育生物学的一个基本问题:遗传物质在分化和发育过程中不是不可逆的改变。这是理论上的一个重大突

破。但是这一成功却导致了更多问题的提出：分化的体细胞 DNA 是如何在卵胞质中去分化，恢复全能性的？卵胞质中的什么因子在核去分化中起重要作用？如何才能更有效地恢复全能性？等等。这些问题的解决将大大提高核移植的成功率，使该技术在理论和应用研究中发挥更重大的作用。

参 考 文 献

- McGrath J, Solter D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development *in vitro*. *Science*, 1984, **226** (4680): 1317~ 1319
- Tsunoda Y, Yasui T, Shida Y, *et al.* Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. *J Exp Zool*, 1987, **242** (2): 147~ 151
- Campbell K H, Loi P, Otaegui P J, *et al.* Sheep cloned by nuclear transfer from a culture cell line. *Nature*, 1996, **380** (6569): 64 ~ 66
- Wilmut I, Schnieke A E, McWhi J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385** (6619): 810~ 813
- Kelly S J. Studies of the development potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J Exp Zool*, 1977, **200** (3): 365~ 367
- Campbell K H S, Loi P, Otaegui P J, *et al.* Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev Reprod*, 1996, **1** (1): 40~ 46
- Wakayama T, Rodriguez I, Perry A C F, *et al.* Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (26): 14984~ 14989
- Campbell K H S. Nuclear equivalence, nuclear transfer and the cell cycle. *Cloning*, 1999, **1** (1): 3~ 15
- Campbell K H S, Loi P, Cappai P, *et al.* Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. *Biol Reprod*, 1994, **50** (6): 1385~ 1393
- Howlett S K, Barton S C, Surani M A. Nuclear cytoplasmic interactions following nuclear transplantation in mouse embryos. *Development*, 1987, **101** (4): 915~ 923
- Kanka J, Fulka J, Petr J. Nuclear transplantation in bovine embryo: Fine structural and autoradiographic studies. *Mol Reprod Dev*, 1991, **29** (2): 110~ 116
- de Sousa P A, Winger Q, Hill J R, *et al.* Reprogramming of fibroblast nuclei after transfer into bovine oocytes. *Cloning*, 1999, **1** (1): 63~ 69
- Kline D. Activation of the mouse egg. *Theriogenology*, 1996, **45** (1): 81~ 90
- Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **394** (6691): 369~ 374
- Ogura A, Inoue K, Takano K, *et al.* Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells. *Mol Reprod Dev*, 2000, **57** (1): 55~ 59
- Piotrowska K, Modlinshi J A, Korwir-kossakowski M, *et al.* Effects of preactivation of ooplasts or synchronization of blastomere nuclei in G1 on preimplantation development of rabbit serial nuclear transfer embryos. *Biol Reprod*, 2000, **63** (3): 677~ 682
- Otaegui P J, O'Neil G T, Campbell K H S, *et al.* Use of nocodazole to control the cell cycle in the preimplantation mouse embryo. *Mol Reprod Dev*, 1994, **39** (2): 147~ 152
- Cibelli J B, Stice S L, Golucke P J, *et al.* Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, **280** (5367): 1256~ 1258
- Wakayama T, Yanagimachi R. Cloning of male mice from adult tail tip cells. *Nature Genet*, 1999, **22** (2): 127~ 128
- Aldhous P. Cloning's owners go to war. *Nature*, 2000, **405** (6787): 610~ 612

Cell Cycle Interactions Between Donor Nucleus and Recipient Cytoplasm in Mammalian Nuclear Transfer*

LI Jin-Song, CHEN Da-Yuan**

(State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Nuclear transfer from somatic cells provides a wide range of opportunities, both in basic and applied research. However, the efficiency of the nuclear transfer procedure remains low. The fundamental reasons are that the basic mechanisms of nuclear transfer are unclear. The research work in the past on these questions have shown that two groups of factors have multiple effects on the reconstructed embryos in nuclear transfer. The first are those involved in maintaining ploidy of the reconstructed embryos and the second are in reprogramming the donor nuclei. Some of the cell cycle interactions between the donor nucleus and recipient cytoplasm are reviewed.

Key words nuclear transfer, nuclear cytoplasmic interaction, reprogramming, cell cycle

* This work was supported by grants from Climbing Project of China National Ministry of Sciences and Technology (97021109-2) and Important Project of Knowledge Innovation of the Chinese Academy of Sciences (KSCX-05-01).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62560528, E-mail: chendy@panda.ioz.ac.cn

Received: August 17, 2001 Accepted: October 18, 2001